



TITLE:

Impact of Cell Composition and Geometry
on Human Induced Pluripotent Stem Cells-
Derived Engineered Cardiac Tissue(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Nakane, Takeichiro

CITATION:

Nakane, Takeichiro. Impact of Cell Composition and Geometry on Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Engineered Cardiac Tissue. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20972>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	中根 武一郎
論文題目	Impact of Cell Composition and Geometry on Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Engineered Cardiac Tissue (細胞密度および組織形状がヒト人工多能性幹細胞由来の大型心臓組織に与える影響についての検討)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)は心筋細胞など心臓を構成する種々の細胞への分化誘導が可能で、心不全に対する細胞移植治療の有力な細胞源と考えられている。さらに組織工学の技術を用いて心臓組織を作製することで、多量の細胞を効率的に心表面に移植することが可能となる。三次元培養装置を用いて心臓組織を作製し検討した既報では、ヒト iPS 細胞由来の心臓細胞と細胞外マトリックス (I 型コラーゲン、マトリゲル)から径 1 mm、長さ 10 mm 程度の円柱状の組織を作製した。この際、心筋細胞と血管内皮細胞、血管壁細胞を共培養することで、組織の形態的・機能的成熟化が促進されることを示した。本研究ではこの技術を発展させ、より大型かつ機能的に成熟したパッチ状の移植用心臓組織を開発することを目的とした。</p> <p>まずポリジメチルシロキサン (PDMS)を用いて組織培養皿を作製した。この培養皿は 2x2 cm の大きさで内部に PDMS のポストを有した。ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞、内皮細胞、壁細胞を含む全 600 万の細胞と細胞外マトリックス (400 μl)の混合液を培養皿に注入し、37℃のインキュベーター内で培養した。混合液は 1 時間以内にゲル化し、数日後には自己拍動を開始し、14 日間の培養の後に一辺 1.5 cm 大の組織が形成された。培養皿内のポストの配置により最終的な組織形態の調整が可能で、短いポストを互い違いに配置したものからは網目状 (mesh, ME)、長いポストを並列させたものからは柵状 (multiple linear bundles, ML)、ポストの無いものからは穴の無いシート状 (plain sheet, PS)の組織が得られた。</p> <p>次に各形態の特性を比較した。エチジウムホモダイマー3 染色の結果、死細胞率は ME 群 3.4±2.1、ML 群 12.7±10.1%で、PS 群 32.9±17.9%より有意に低かった (ME 対 ML: p=0.044、ME 対 PS: p<0.0001)。心筋トロポニン T 染色による筋原線維走行の観察では、PS 群は線維が不規則に走行していたのに対し、ME、ML 群では組織長軸方向への高い配向性を認めた。また ME、ML 群の収縮力は 0.54±0.21 及び 0.56±0.21 mN/mm² で PS 群の 0.28±0.12 mN/mm² より有意に高かった (ME 対 PS: p=0.019、ML 対 PS: p=0.012)。以上より、網目状が細胞生存率および配向性が高く、機能的に優れた形態であることが示された。</p> <p>この網目状心臓組織において、組織作製時の細胞数の増加を試みた。細胞とマトリックスの比率を維持して 900 万、1200 万と細胞数を増加したところ、死細胞率が 11.2±6.0、15.3±8.2%と上昇し (600 万に対し p=0.0027、p<0.0001)、収縮力が 0.20±0.06、0.18±0.06 mN/mm²と低下した (600 万に対しても p<0.0001)。組織の厚さが増したことによる影響が考えられたため、マトリックス量を変えず細胞数のみを 1200 万に増やしてみたが、死細胞率 14.8±8.8%、収縮力 0.29±0.11 mN/mm² (600 万に対し p<0.0001、p<0.0025)と不良だった。したがって 2x2 cm 大の培養皿においては 600 万細胞/400 μl マトリ</p>			

<p>ックスが最適な細胞密度および量であると判断した。</p> <p>続いて網目状組織 1 枚をラットの心筋梗塞後 1 週間のモデルに移植し、4 週間の経過観察後に心臓を摘出した。移植 4 週間後の心臓超音波検査にて、心駆出率は非移植群の 49.3±13.2%に対し移植群では 66.6±5.8%と有意に高値であった（p=0.028）。またマッソン・トリクローム染色にて、左心室壁に占める心筋梗塞巣の面積が非移植群 23.9±7.2% に対し移植群では 11.6±7.6%と低値であった（p=0.031）。このことから移植組織の心筋梗塞に対する治療効果が示された。</p> <p>最後に ME のポストの配置パターンを維持した 4x4 cm 大の PDMS 培養皿を用いて、2400 万細胞から一辺 3 cm 大のより大型の網目状心臓組織の作製に成功した。培養皿の大きさと細胞数を調整することで、容易に臨床応用に適したサイズに組織を拡大できることを確認した。</p> <p>以上より、この網目状心臓組織による細胞移植は大動物を用いた前臨床試験にも実行可能で、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の実現に向けて有用な方法であると考える。</p>			
<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>ヒト iPS 細胞を用いた細胞移植が心不全の新たな治療法として期待されている。本研究ではヒト iPS 細胞から移植用の心臓組織を作製し、その形状や細胞数・細胞密度が組織に与える影響を検討した。</p> <p>先ずポリジメチルシロキサン製の組織培養皿に、ヒト iPS 細胞から分化誘導した心臓血管系細胞を細胞外マトリックスのゲルとともに注入し、15 mm 大の組織を作製した。培養皿内に配置したポストでゲルを仕切ることによって、短いポストを互い違いに配置したものからは網目状、長いポストを並列に配置したものからは柵状、ポストの無いものからは単純なシート状の組織が形成された。各形状の特性を評価したところ、網目状組織が最も高い細胞生存性、心筋細胞配向性、筋収縮力を示した。次に網目状組織作製における細胞数や細胞密度を検討し、600 万の細胞数と 1,500 万/mL の細胞密度が最適な条件であることを決定した。最適化した網目状組織をラット心筋梗塞モデルの心表面に移植したところ、線維化の抑制及び心機能の改善を示した。また、培養皿の面積を拡大しそれに応じて細胞数やマトリックスを増量することで、大動物を用いた移植実験に適した 30 mm 大の網目状組織の作製にも成功した。</p> <p>以上の研究は、ヒト iPS 細胞から機能的かつ臨床応用に向けた新規の心臓組織の作製方法とその組織の治療効果を示し、心不全に対する再生治療の実現に向けて有望な技術基盤となり得る。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 12 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
<p>要旨公開可能日： 年 月 日 以降</p>			